

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 195 01 032 A 1**

⑤1 Int. Cl. 6:
A 61 K 38/55
A 61 K 38/19

②1 Aktenzeichen: 195 01 032.9
②2 Anmeldetag: 14. 1. 95
④3 Offenlegungstag: 18. 7. 96

DE 195 01 032 A 1

⑦1 Anmelder:
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin,
13125 Berlin, DE

⑦2 Erfinder:
Wernicke, Dirk, Dr., 13189 Berlin, DE

Der Inhalt dieser Schrift weicht von den am Anmeldetag eingereichten Unterlagen ab

⑤4 Mittel zur Behandlung von rheumatischen Erkrankungen

⑤7 Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Behandlung von rheumatischen Erkrankungen, insbesondere von solchen Erkrankungen, die durch Gelenkdestruktion gekennzeichnet sind wie chronische Polyarthritis und Osteoarthritis. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein neues Mittel zur Behandlung dieser Erkrankungen zu entwickeln. Das neue Mittel ist dadurch gekennzeichnet, daß es die bei der Erkrankung auftretende Matrix-Metallprotease Kollagenase-3, ggf. in Kombination mit der Hemmung anderer Matrix-Metallproteasen, unwirksam macht.

Das wird u. a. erreicht durch

- Unwirksammachen der Kollagenase-3 auf der Ebene der Genregulation durch Unterdrückung ihrer Transkription
- Hemmung des Prozesses der Proenzym-Aktivierung der Kollagenase-3
- Enzyminhibitoren oder
- Induktion natürlicher Inhibitoren von Matrix-Metallproteasen.

DE 195 01 032 A 1

B1

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Behandlung von rheumatischen Erkrankungen, insbesondere von solchen Erkrankungen, die durch Gelenkdestruktion gekennzeichnet sind wie chronische Polyarthritis und Osteoarthritis. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Zahlreiche, zumeist entzündliche Gelenkerkrankungen sind charakterisiert durch progressive Gelenkdestruktion, die mit einer röntgenologisch nachweisbaren Zerstörung vor allem des Knorpel- und Knochengewebes einhergeht und in ihrer Progredienz zum vollständigen Funktionsverlust der Gelenke führt. Zu diesen Gelenkerkrankungen zählen vor allem die chronische Polyarthritis, die Osteoarthritis sowie posttraumatische und postinfektiöse Gelenkentzündungen. Besonders die chronische Polyarthritis ist mit ihrer Inzidenz von 1–2% die häufigste entzündliche Bindegewebserkrankung und führt nach einer Krankheitsdauer von 10 Jahren bei über der Hälfte der Betroffenen zur Invalidisierung. Die Osteoarthritis ist vor allem im Ergebnis altersbedingter degenerativer Gelenkveränderungen eine verbreitete Erkrankung.

Die Therapie entzündlicher Gelenkerkrankungen ist vor allen auf die Behandlung der Entzündung mit Glukokortikoiden und nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) gerichtet. Bei der chronischen Polyarthritis werden darüber hinaus sogenannte Basistherapeutika mit unterschiedlichem Wirkungsmechanismus und dem vorrangigen Ziel einer Glukokortikoideinsparung gegeben. Ergänzt wird die medikamentöse Therapie durch komplexe physiotherapeutische Maßnahmen. Wegen fehlender kausaler Therapie entzündlicher Gelenkerkrankungen bleibt der operative Gelenkersatz oft die einzige Möglichkeit für einen gewissen Funktionserhalt der Gelenke.

Die Forschungsergebnisse an in vitro-Systemen und Tiermodellen der zurückliegenden Jahre haben gezeigt, daß der Prozeß der progredienten Gelenkdestruktion nicht durch eine massive antientzündliche Therapie aufzuhalten ist. Darüber hinaus wurde deutlich, daß auch die Hemmung bereits bekannter Proteasen, wie der Matrix-Metallproteasen interstitielle Kollagenase und Stromelysin-1, den Prozeß der Gelenkdestruktion unwesentlich aufhält (Greenwald et al, J. Rheumatol 19: 927–938; 1992).

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Mittel zur Realisierung einer neuen therapeutischen Strategie zur Behandlung von rheumatischen Erkrankungen, die mit Gelenkdestruktion einhergehen, wie entzündliche Gelenkerkrankungen, zu entwickeln.

Es wurde überraschenderweise gefunden, daß die Gelenkschleimhaut von an chronischer Polyarthritis bzw. an Osteoarthritis erkrankten Patienten in den meisten Fällen eine weitere Protease, die Matrix-Metallprotease Kollagenase-3, enthält. Kollagenase-3 ist zusätzlich zu zwei anderen Matrix-Metallproteasen, interstitieller Kollagenase und Stromelysin-1 vorhanden. In normaler Gelenkschleimhaut sowie anderen humanen Geweben tritt Kollagenase-3 dagegen nicht auf. Es wurde nachgewiesen, daß die gefundenen Matrix-Metallproteasen, insbesondere Kollagenase-3, ursächlich an der Gelenkdestruktion beteiligt sind.

Das neue therapeutische Mittel ist dadurch gekennzeichnet, daß es Kollagenase-3, ggf. unter gleichzeitiger Hemmung anderer Proteasen, unwirksam macht. Im einzelnen wird alternativ eines der in den Ansprüchen 1

bis 14 gekennzeichneten Mittel eingesetzt.

Eine Möglichkeit zum Einsatz des neuen therapeutischen Mittels besteht darin, daß es auf der Ebene der Genregulation eingreift und die Transkription der Kollagenase-3 unterdrückt. Diese Unterdrückung erfolgt erfindungsgemäß durch im Mittel enthaltene

- Antisense-Oligonukleotide,
- Stoffe, die die Matrix-Metallprotease-induzierende Wirkung von Cytokinen wie Interleukin-1 und TNF- α hemmen,
- Stoffe, die die repressive Wirkung von Cytokinen, wie TGF- β , fördern,
- Rezeptorantagonisten oder veränderte Agonisten von Faktoren, die die Matrix-Metallproteasen-Transkription induzieren,
- veränderte Glukokortikoidrezeptor-ähnliche Moleküle, die Transkriptions-aktivierende Faktoren unwirksam machen oder
- Stoffe, die eine Wechselwirkung spezieller RNA-Bindungsproteine mit der mRNA hemmen und dadurch eine Stabilisierung der Kollagenase-3 mRNA verhindern.

Als Antisense-Oligonukleotide werden bevorzugt solche eingesetzt, die gegen regulatorische Sequenzen in den flankierenden Genabschnitten oder den Splicing-Abschnitten gerichtet sind.

Cytokine mit Matrix-Metallprotease-induzierender Wirkung werden gehemmt, wie Interleukin-1 (IL-1 α und IL-1 β), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Tumornekrosefaktor (TNF- α) oder der Plättchen-aktivierende Faktor (PDGF).

Eine Hemmung der Transkription läßt sich mit verschiedenen natürlich vorkommenden oder synthetisch hergestellten Verbindungen wie Hormonen (vor allem Glukokortikoiden) und Retinoiden erreichen.

Eine weitere erfindungsgemäße Möglichkeit besteht darin, mit dem Mittel die Proenzym-Aktivierung von Kollagenase-3 zu hemmen. Dazu stehen zur Verfügung

- die Hebung des Vorgangs der limitierten Proteolyse als enzymatische Form der Proenzym-Aktivierung von Kollagenase-3,
- die Hemmung der Proenzym-Aktivierung von Kollagenase-3, verursacht durch Oxydation des Cysteins im Propeptid,
- die Hemmung der Proenzym-Aktivierung von Kollagenase-3, hervorgerufen durch Änderung der Proteinstruktur.

Die enzymatische Proenzym-Aktivierung von Kollagenase-3, verursacht durch Proteasen, wie Matrix-Metallproteasen und Serinproteasen bzw. durch Autoaktivierung, wird durch das erfindungsgemäße Mittel gehemmt. Darüber hinaus wird die Wirkung von Substanzen, wie oxydiertes Glutation, Hypochlorsäure oder Organomercuriaten, die über Oxydation des Cysteins im Propeptid von Kollagenase-3 zu deren Aktivierung führen, unterdrückt.

Desgleichen werden Vorgänge, die über eine Änderung der Proteinstruktur von Kollagenase-3 zu deren Aktivierung führen, wie durch SDS oder chaotrope Reagentien, unterdrückt.

Es besteht ferner die Möglichkeit, die im Organismus gebildete Kollagenase-3 durch Enzym-inhibierende Substanzen zu hemmen. Die Verbindungen α_2 -Makroglobulin, chemotherapeutische Agentien, Antibiotika

wie Tetracycline und deren Derivate sowie synthetische Peptide sind bevorzugt dafür geeignet.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, mit dem erfindungsgemäßen Mittel natürliche Inhibitoren von Matrix-Metallproteasen zu induzieren. Dazu zählen bevorzugt

- natürlich vorkommende oder synthetisch hergestellte Verbindungen wie all-trans-Retinsäure und deren synthetische Vitamin A Analoga (Retinoide) und
- Cytokine wie Interleukin-6 und -11 (IL-6, IL-11), der transformierende Wachstumsfaktor (TGF- β), der Leukämieinhibierende Faktor (LIF) und Onkostatin.

Durch die Induktion natürlicher Inhibitoren von Matrix-Metallproteasen wird erreicht, die Balance zwischen Kollagenase-3 und ihren Inhibitoren zugunsten letzterer zu verschieben.

Von wichtiger Bedeutung ist eine Anwendung des erfindungsgemäßen Mittels in Kombination mit der gleichzeitigen Hemmung anderer Matrix-Metallproteasen. Die Kombination wird vor allem durch die in den Ansprüchen 6–13 enthaltenen Maßnahmen realisiert, kann aber auch durch gesonderte, für die anderen Proteasen an sich bekannte Verfahrensschritte erreicht werden. Durch die Kombination wird der therapeutische Effekt erheblich verstärkt.

Die praktische Realisierung erfolgt zweckmäßigerweise durch Entnahme einer Gewebeprobe des Patienten, entweder intraoperativ oder durch Biopsie, nachfolgende Analyse des enthaltenen Matrix-Metallproteasespektrums und anschließende Festlegung eines kausalen und "maßgeschneiderten" Mittels.

Patentansprüche

1. Mittel zur Behandlung von rheumatischen Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß es die bei der Erkrankung auftretende Matrix-Metallprotease Kollagenase-3, ggf. in Kombination mit der Hemmung anderer Matrix-Metallproteasen, unwirksam macht.
2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es das Unwirksammachen der Kollagenase-3 auf der Ebene der Genregulation durch Unterdrückung ihrer Transkription erreicht.
3. Mittel nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß es die Transkription durch Antisense-Oligonukleotide gegen regulatorische Sequenzen in den flankierenden Genabschnitten und den Splicing-Abschnitten unterdrückt.
4. Mittel nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß es die Transkription durch Hemmung der Matrix-Metallprotease-induzierenden Wirkung von Cytokinen wie TNF- α oder Interleukin-1 unterdrückt.
5. Mittel nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß es die Transkription durch Förderung der Matrix-Metallprotease-hemmenden Wirkung von Cytokinen wie TGF- β unterdrückt.
6. Mittel nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß es die Transkription durch natürlich vorkommende oder synthetisch hergestellte Verbindungen wie Hormone, insbesondere Glukokortikoide oder Retinoide, unterdrückt.
7. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,

daß es den Prozeß der Proenzym-Aktivierung der Kollagenase-3 hemmt.

8. Mittel nach Anspruch 1 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß es die Proenzym-Aktivierung durch eine limitierte Proteolyse mit anderen Proteasen, wie andere Matrix-Metallproteasen oder Serinproteasen, hemmt.

9. Mittel nach Anspruch 1 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß es die Proenzym-Aktivierung durch Oxydation des Cysteins im aktiven Zentrum von Kollagenase-3 hemmt.

10. Mittel nach Anspruch 1 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß es die Proenzym-Aktivierung durch Änderung der Proteinstruktur von Kollagenase-3 durch Reagentien wie SDS oder chaotrope Reagentien hemmt.

11. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Kollagenase-3 durch Enzyminhibitoren wie α_2 -Makroglobulin, chemotherapeutische Agentien, Antibiotika wie Tetracycline und deren Derivate oder synthetische Peptide hemmt.

12. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Kollagenase-3 durch Induktion natürlicher Inhibitoren von Matrix-Metallproteasen hemmt.

13. Verfahren nach Anspruch 1 und 12, dadurch gekennzeichnet, daß es die natürlichen Inhibitoren von Matrix-Metallproteasen durch natürlich vorkommende oder synthetisch hergestellte Verbindungen wie all-trans-Retinsäure oder Retinoide induziert.

14. Mittel nach Anspruch 1 und 12, dadurch gekennzeichnet, daß es die natürlichen Inhibitoren von Matrix-Metallproteasen durch Cytokine wie Interleukin-6 und -11, transformierenden Wachstumsfaktor TGF- β , Leukämie-inhibierenden Faktor oder Onkostatin induziert.

- Leerseite -



(19) **FEDERAL REPUBLIC
OF GERMANY**
[Seal]

GERMAN PATENT OFFICE

(12) **Offenlegungsschrift (Unexamined)**
(10) **DE 195 01 032 A 1**

(21) Reference: 195 01 032.9
(22) Filing date: January 14, 1995
(43) Publication date: July 18, 1996

(51) Int. Cl. ⁶:
A 61 K 38/55
A 61 K 38/19

(71) Applicant:

Max-Delbrück-Centrum für Molekulare
Medizin, 13125 Berlin, DE

(72) Inventor:

Wernicke, Dirk, Dr., 13189 Berlin, DE

The content of this specification differs from the documents submitted on the filing date.

(54) Agent for the Treatment of Rheumatic Diseases

(57) The invention relates to an agent for the treatment of rheumatic diseases, particularly those diseases that are characterized by joint destruction, such as chronic polyarthritis and osteoarthritis. The fields of application of the invention are medicine and the pharmaceutical industry.

The invention is based on the problem of developing a new agent for the treatment of these diseases.

The new agent is characterized in that it inactivates the matrix metalloprotease collagenase-3 occurring during the disease, possibly in combination with the inhibition of other matrix metalloproteases.

This is accomplished, among other things, by:

- inactivation of collagenase-3 at the level of gene regulation by suppressing its transcription
- inhibition of the process of proenzyme activation of collagenase-3
- enzyme inhibitors, or
- induction of natural inhibitors of matrix metalloproteases.

Description

The invention relates to an agent for the treatment of rheumatic diseases, particularly those diseases that are characterized by joint destruction, such as chronic polyarthritis and osteoarthritis. The fields of application of the invention are medicine and the pharmaceutical industry.

Numerous, mostly inflammatory joint diseases are characterized by progressive joint destruction, which is associated with a destruction primarily of cartilage and bone tissue, detectable by X-ray, and which, in its progredient course, leads to complete functional loss of the joints. Included among these joint diseases are, above all, chronic polyarthritis, osteoarthritis, and post-traumatic and post-infection joint inflammation. Especially chronic polyarthritis, with an incidence of 1-2%, is the most common inflammatory connective tissue disease and, after a disease period of 10 years, leads to invalidity in more than half of those affected. Osteoarthritis is primarily a wide-spread disease ensuing from age-related degenerative joint changes.

The therapy of inflammatory joint diseases is primarily directed at the treatment of the inflammation with glucocorticoids and nonsteroidal antirheumatics (NSAR). In the case of chronic polyarthritis, moreover, so-called base therapy agents with differing mechanisms of action and the primary goal of minimizing glucocorticoids are administered. The medication therapy is supplemented by complex physiotherapeutic measures. Because of the lack of a causal therapy of inflammatory joint diseases, surgical joint replacement often remains the sole possibility for a certain functional maintenance of the joints.

The research results on *in vitro* systems and on animal models of past years have shown that the process of progredient joint destruction cannot be halted by a massive anti-inflammatory therapy. Beyond this, it has become clear that even the inhibition of already known proteases, such as matrix metalloproteases, interstitial collagenase, and stromelysin-1, does not substantially delay the process of joint destruction (Greenwald et al., J. Rheumatol 19: 927-938, 1992).

The invention is based on the problem of developing an agent for providing a new therapeutic strategy for the treatment of rheumatic diseases that are associated with joint destruction, such as inflammatory joint diseases.

It was surprisingly found that the joint mucous membrane of patients suffering from chronic polyarthritis or from osteoarthritis contains, in most cases, an additional protease, the matrix metalloprotease collagenase-3. Collagenase-3 is present in addition to two other matrix metalloproteases, interstitial collagenase and stromelysin-1. In normal joint mucous membrane as well as in other human tissues, on the other hand, collagenase-3 is not present. It was demonstrated that the matrix metalloproteases found, in particular collagenase-3, are involved causally in joint destruction.

The new therapeutic agent is characterized in that it inactivates collagenase-3, possibly with simultaneous inhibition of other proteases. In detail, alternatively, one of the agents characterized in claims 1 to 14 is employed.

A possibility for the use of the new therapeutic agent exists in the fact that it acts at the level of gene regulation and suppresses the transcription of collagenase-3. This suppression occurs in accordance with the invention by way of:

- antisense oligonucleotides,
- substances that inhibit the matrix metalloprotease-induced action of cytokines, such as interleukin-1 and TNF- α ,
- substances that promote the repressive action of cytokines, such as TGF- β ,
- receptor antagonists or modified agonists of factors that induce matrix metalloprotease transcription,
- modified glucocorticoid receptor-like molecules that inactivate the transcription-activating factors, or
- substances that inhibit an interaction of special RNA-binding proteins with the mRNA and thereby prevent a stabilization of the collagenase-3 mRNA,

which are contained in the agent.

Employed as antisense oligonucleotides are preferably those that are targeted against regulatory sequences in the flanking gene segments or in the splicing segments.

Cytokines having a matrix metalloprotease-inducing effect are inhibited, such as interleukin-1 (IL-1 α and IL-1 β), epidermal growth factor (EGF), tumor necrosis factor (TNF- α), or platelet-activating factor (PDGF).*

* [Translator's Note] sic; (PAF)?

An inhibition of transcription can be accomplished using various naturally occurring or synthetically prepared compounds, such as hormones (above all, glucocorticoids) and retinoids.

A further possibility in accordance with the invention consists in using the agent to inhibit the proenzyme activation of collagenase-3. The following are provided for this purpose:

- the promotion of the process of limited proteolysis as an enzymatic form of the proenzyme activation of collagenase-3,
- the inhibition of the proenzyme activation of collagenase-3, caused by the oxidation of the cysteine in the propeptide,
- the inhibition of the proenzyme activation of collagenase-3 brought about by modification of the protein structure.

The enzymatic proenzyme activation of collagenase-3 caused by proteases, such as matrix metalloproteases and serine proteases, or else by autoactivation is inhibited by the agent in accordance with the invention. Beyond this, the action of substances such as oxidized glutathione, hypochloric acid, or organomercuriates, which lead via oxidation of the cysteine in the propeptide of collagenase-3 to its activation, is suppressed.

Likewise, processes that lead via a modification of the protein structure of collagenase-3 to its activation, such as by means of SDS or chaotropic reagents, are suppressed.

There exists the further possibility of inhibiting the collagenase-3 that is formed in the organism by using enzyme-inhibiting substances. The compounds α_2 -macroglobulin, chemotherapeutic agents, and antibiotics such as tetracycline and its derivatives, as well as synthetic peptides are preferably suited for this purpose.

A further possibility exists in using the agent in accordance with the invention to induce natural inhibitors of matrix metalloproteases. These include preferably

- naturally occurring or synthetically prepared compounds, such as all-trans retinoic acid and its synthetic vitamin A analogues (retinoids), and
- cytokines, such as interleukin-6 and -11 (IL-6, IL-11), transforming growth factor (TGF- β), leukemia-inhibiting factor (LIF), and oncostatin.

The induction of natural inhibitors of matrix metalloproteases results in a shift in the balance between collagenase-3 and its inhibitors in favor of the latter.

Of crucial importance is an application of the agent of the invention in combination with the simultaneous inhibition of other matrix metalloproteases. This combination is realized, above all, through the measures contained in claims 6-13, but it can be achieved also through separate procedural steps that are in themselves known for the other proteases. The therapeutic effect is substantially enhanced by this combination.

The practical realization is obtained, in an appropriate manner, by taking a tissue sample of the patient, either intraoperatively or through biopsy, subsequently analyzing the spectrum of matrix metalloproteases obtained, and then specifying a causal and "tailor-made" agent.

Patent Claims

1. An agent for the treatment of rheumatic diseases, **characterized in that** it inactivates the matrix metalloprotease collagenase-3 occurring during the disease, possibly in combination with the inhibition of other matrix metalloproteases.
2. The agent according to claim 1, further characterized in that it accomplishes the inactivation of collagenase-3 at the level of gene regulation by suppressing its transcription.
3. The agent according to claims 1 and 2, further characterized in that it suppresses the transcription by way of antisense oligonucleotides targeted against regulatory sequences in the flanking gene segments and in the splicing segments.
4. The agent according to claims 1 and 2, further characterized in that it suppresses the transcription by inhibition of the matrix metalloprotease-inducing action of cytokines such as TNF- α or interleukin-1.
5. The agent according to claims 1 and 2, further characterized in that it suppresses the transcription by promoting the matrix metalloprotease-inhibiting action of cytokines such as TGF- β .

6. The agent according to claims 1 and 2, further characterized in that it suppresses the transcription by way of naturally occurring or synthetically prepared compounds, such as hormones, in particular glucocorticoids or retinoids.
7. The agent according to claims 1, further characterized in that it inhibits the process of proenzyme activation of collagenase-3.
8. The agent according to claims 1 and 7, further characterized in that it inhibits the proenzyme activation by limited proteolysis with other proteases, such as other matrix metalloproteases or serine proteases.
9. The agent according to claims 1 and 7, further characterized in that it inhibits the proenzyme activation through oxidation of cysteine in the active site of collagenase-3.
10. The agent according to claims 1 and 7, further characterized in that it inhibits the proenzyme activation by modification of the protein structure of collagenase-3 through reagents such as SDS or chaotropic reagents.
11. The agent according to claim 1, further characterized in that it inhibits collagenase-3 by way of enzyme inhibitors, such as α_2 -macroglobulin, chemotherapeutic agents, antibiotics, such as tetracycline and its derivatives, or synthetic peptides.
12. The agent according to claim 1, further characterized in that it inhibits collagenase-3 by induction of natural inhibitors of matrix metalloproteases.
13. Process* according to claims 1 and 12, further characterized in that it induces the natural inhibitors of matrix metalloproteases by way of naturally occurring or synthetically prepared compounds, such as all-trans retinoic acid or retinoids.
14. The agent according to claims 1 and 12, further characterized in that it induces the natural inhibitors of matrix metalloproteases by way of cytokines, such as interleukin-6 and -11, transforming growth factor TGF- β , leukemia-inhibiting factor, or oncostatin.

* [Translator's Note] sic; The agent?